

明 細 書

高耐久性液体クロマトグラフィー用充填剤

技術分野

- [0001] 本発明は、液体クロマトグラフィー用充填剤の製造法に関するものである。
- [0002] 液体クロマトグラフィーは医薬品や食品、天然化合物等の分野で重要な分離分析手段として幅広い分野で使用されている。通常、液体クロマトグラフィー用充填剤には優れた機械強度、良い分離性能等を備えた多孔性シリカゲルの表面をシラン化合物で化学修飾したものが多く用いられる。表面修飾シリカゲルとしては、表面のシラノール基に化学結合によりオクタデシル基を導入したもの(ODS)が最も一般的であるが、導入基がオクチル基、ブチル基、メチル基等であるものも知られている。また、アルキル基は末端にフェニル基やアミノ基、シアノ基、ニトロ基等の官能基を有する場合もある。
- [0003] 液体クロマトグラフィーによる化合物の分析および分取においてはその分離条件として酸性の移動相やアルカリ性の移動相を用いることが多い。特に、ペプチド、タンパク質等を含む生体試料を分析および分取の対象とする場合には、酸による加水分解で修飾基が母体シリカゲルから脱離したりアルカリにより母体シリカゲルが溶解する等の問題がある。そのため長寿命かつ高耐久性の液体クロマトグラフィー用充填剤が要求される。

背景技術

- [0004] 従来、高耐久性の液体クロマトグラフィー用充填剤の製造法としては、シリカゲル表面にペルヒドロキシポリシラザンのようなポリシラザンを含浸させ、次いでこのシリカゲルを焼成することにより表面にセラミックスのコーティングを施し、これに修飾剤シラン化合物を化学結合させる方法(特許文献1参照)、ヒドロシリル基を有するシリコーン化合物をシリカゲル表面で重合させてシリコーンポリマーを形成させる方法(特許文献2参照)、修飾剤シラン化合物として、その構造内にオクタデシルジ- α -ブチルクロロシランやオクチルジイソプロピルクロロシランのような立体保護基を有する一官能性シランを用いる方法(特許文献3)が提案されている。

[0005] しかし、特許文献1のセラミックスによるコーティングおよび特許文献2のポリマーによるコーティングはいずれもシリカゲルの特性を失う恐れがあり、特許文献3の立体保護基は液体クロマトグラフィー用充填剤としての選択性を大きく変えることになる。

特許文献1:特開平10-206407号公報。

特許文献2:特開2003-149219号公報。

特許文献3:特開昭63-137750号公報。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

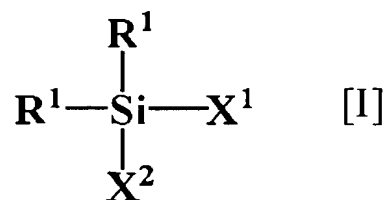
[0006] 本発明は上記のような実情から耐酸性および耐アルカリ性に優れた高耐久性液体クロマトグラフィー用充填剤を提供することを課題とするものである。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者は、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、特定の構造を有するシラン化合物を用いてシリカゲル表面を化学修飾する工程と、次いで特定の構造を有する二官能性環状シラザン化合物を用いるエンドキャップ反応工程とを組み合わせることにより、シリカゲルの特性を失うことなく、かつ液体クロマトグラフィー用充填剤としての選択性を大きく変えることなく、しかも耐酸性、耐アルカリ性に極めて優れた新規高耐久性液体クロマトグラフィー用充填剤の製造法を確立するに至った。

[0008] すなわち、本発明は、シリカゲルに、一般式[I]で表される二官能性シラン化合物による化学修飾を施し、得られた化学修飾シリカゲルに、一般式[II]で表される二官能性環状シラザンを用いてエンドキャップ反応を行うことを特徴とする液体クロマトグラフィー用充填剤の製造法である。

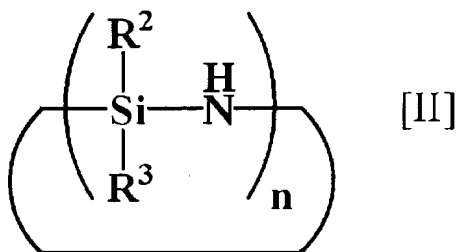
[化1]



[式中、 X^1 および X^2 は、同一または異なり、水素原子、ハロゲン原子もしくは炭素数1～4のアルコキシ基であり、 R^1 は置換基を有していてもよいアルキル基またはアリール基である。]

ハロゲン原子は X^1 と X^2 で同じでも異なってもよい。

[化2]



[式中、 R^2 および R^3 は、同一または異なり、炭素数1～4のアルキル基であり、 n は環を形成するユニットの数を示す値で、2～10の整数である。]

更に、本発明は上記方法により得られた液体クロマトグラフィー用充填剤を用いた液体クロマトグラフィー用カラム、そのカラムを用いた分析方法または分取方法、特に生体試料に含まれるペプチドまたはタンパク質の分析または分取方法を提供する。

[0009] 本発明方法に用いる好ましい原料シリカゲルは、平均粒子径が通常1～1000 μm 、好ましくは2～200 μm であり、細孔径が通常10～10000オングストローム、好ましくは50～3000オングストロームであり、表面積が通常1～1000 m^2/g 、好ましくは5～600 m^2/g である多孔性シリカゲルである。高い分離性能を得るためには原料シリカゲルとしては高純度かつ球形のものが好ましい。

[0010] 一般式[I]で表される二官能性シラン化合物において、 R^1 としてのアルキル基は、直鎖状アルキル基、分枝状アルキル基、環状アルキル基等であってもよい。 R^1 がアルキル基の場合、炭素数は特に限定しないが、好ましくは1～30、より好ましくは2～8である。 R^1 としてのアリール基はフェニル基、トリル基、メシチル基、ナフチル基等であってもよい。

[0011] 一般式[I]中の R^1 としてのアルキル基は末端にアリール基、アミノ基($-\text{NH}$)、シアノ基($-\text{CN}$)もしくはニトロ基($-\text{NO}$)を有するか、または非末端にアミド基($-\text{NH}$

—C(O)—)、カーバメート基(—O—C(O)—NH—)、カーバマイド基(—NH—C(O)—NH—)、エステル基(—O—C(O)—)もしくはカーボネート基(—O—C(O)—O—)を有していてもよい。

[0012] 一般式[I]で表される二官能性シラン化合物は、水素原子、ハロゲン原子またはアルコキシル基を有するジアルキルシランまたはジアリールシランである。具体的には、ジメチルジクロロシラン、ジメチルジメトキシシラン、ジメチルジエトキシシラン、ジエチルジクロロシラン、ジエチルジメトキシシラン、ジエチルジエトキシシラン、ジ—n—プロピルジクロロシラン、ジ—n—プロピルジメトキシシラン、ジイソプロピルジクロロシラン、ジイソプロピルジメトキシシラン、ジ—n—ブチルジクロロシラン、ジ—n—ブチルジメトキシシラン、ジイソブチルジクロロシラン、ジイソブチルジメトキシシラン、ジ—t—ブチルジクロロシラン、ジ—t—ブチルジメトキシシラン、ジ—n—ペンチルジクロロシラン、ジ—n—ペンチルジメトキシシラン、ジシクロペンチルジクロロシラン、ジシクロペンチルジメトキシシラン、ジ—n—ヘキシルジクロロシラン、ジ—n—ヘキシルジメトキシシラン、ジシクロヘキシルジクロロシラン、ジシクロヘキシルジメトキシシラン、ジ—n—ヘプチルジクロロシラン、ジ—n—ヘプチルジメトキシシラン、ジ—n—オクチルジクロロシラン、ジ—n—オクチルジメトキシシラン、ジフェニルジクロロシラン、ジフェニルジメトキシシラン、ジメシチルジクロロシラン、ジメシチルジメトキシシラン、ジ—(p—トリル)—ジクロロシラン、ビス(3—シアノプロピル)ジクロロシラン、ビス(3—シアノプロピル)ジメトキシシラン等が例示できる。

[0013] 本発明者らは、種々の検討を行った結果、化学修飾剤として二官能性シラン化合物一般式[I]を用いて化学修飾したシリカゲルが、従来の一官能性シラン化合物を用いて化学修飾したものと比較して、耐久性の向上において格段に効果的であることを見い出した。

[0014] 化学修飾反応は公知の方法および条件下で行うことができ、シリカゲルと二官能性シラン化合物[I]を溶媒中で加温して反応させてよい。反応温度は好ましくは60～200℃、より好ましくは100～160℃であり、反応は液相中で行ってよい。溶媒は特に限定しないが、二官能性シラン化合物[I]とは反応せずかつ反応温度下で安定であるベンゼン、トルエン、キシレン、メシチレン等の芳香族炭化水素、ジクロロベンゼン

等の置換芳香族化合物が好適である。反応圧は通常大気圧であるが、0.15～0.49MPaの加圧条件下で反応を行ってもよい。反応時間は好ましくは0.5～20時間、より好ましくは3～10時間である。二官能性シラン化合物[I]の使用量は、二官能性シラン化合物[I]／シリカゲルの重量比で好ましくは0.01～10、より好ましくは0.05～1である。反応系にピリジン、イミダゾールのような塩基性化合物を添加することも好ましい。

[0015] 二官能性シラン化合物[I]は、一官能性のものに比べると、反応可能なサイトが多く、より反応性が高く、また三官能性のものに比べると、副反応を起こすことが少ないといった利点がある。

[0016] 二官能性シラン化合物[I]として、特に、2つの R^1 が同じで炭素数4～30のアルキル基またはアリール基のシラン化合物を用いた場合は、2つの R^1 が異なるアルキル基またはアリール基である二官能性シラン化合物(例えば、オクタデシルメチルジクロロシラン、n-オクチルメチルジクロロシラン等)を用いた場合とは異なり、シリカゲルの単位面積あたりのアルキル基またはアリール基の密度が増大し、疎水力や分離能の向上、さらには耐久性の向上に有利である。

[0017] 化学修飾反応後の反応液をそのまま次のエンドキャッピング反応に用いてもよいが、化学修飾反応液から固形分を取り出してこれを洗浄乾燥してからエンドキャッピング反応に供してもよい。

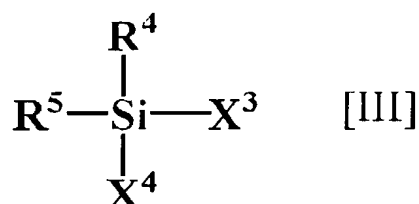
[0018] 化学修飾反応後の反応液に引き続きエンドキャッピング剤を仕込んで反応させてもよいが、化学修飾反応終了後に、未反応の二官能性シラン化合物[I]を加水分解させる場合もある。

[0019] 一般式[II]で表されるエンドキャッピング剤は二官能性環状シラザンであり、好ましくは1, 1, 3, 3, 5, 5-ヘキサメチルシクロトリシラザン、1, 1, 3, 3, 5, 5, 7, 7-オクタメチルシクロテトラシラザン、1, 1, 3, 3, 5, 5, 7, 7, 9, 9-デカメチルシクロペンタシラザン、1, 1, 3, 3, 5, 5, 7, 7, 9, 9, 11, 11-ドデカメチルシクロヘキサシラザン、1, 1, 3, 3, 5, 5-ヘキサエチルシクロトリシラザン、1, 1, 3, 3, 5, 5, 7, 7-オクタエチルシクロテトラシラザン、1, 1, 3, 3, 5, 5, 7, 7, 9, 9-デカエチルシクロペンタシラザン、1, 1, 3, 3, 5, 5, 7,

7, 9, 9, 11, 11-ドデカエチルシクロヘキサシラザン等が例示される。これらは単独で用いても2種以上の混合物で用いてもよい。

エンドキャッピング剤[II]は一般式[III]で表される二官能性シラン化合物と組み合わせて用いてもよい。エンドキャッピング剤[II]と二官能性シラン化合物[III]の割合は、エンドキャッピング剤[II]／二官能性シラン化合物[III]の重量比で好ましくは0.5以上、より好ましくは1以上である。

[0020] [化3]



[式中、 X^3 および X^4 は、同一または異なり、水素原子、ハロゲン原子または炭素数1～4のアルコキシル基であり、 R^4 および R^5 は、同一または異なり、炭素数1～4のアルキル基である。]

二官能性シラン化合物[III]としてはジメチルジクロロシラン、ジメチルジメトキシシラン等が例示される。

[0021] 本発明者らは、種々の検討を行った結果、エンドキャッピングには、一般式[II]で表される二官能性環状シラザンを用いることで、従来の一官能性エンドキャッピング剤としてのトリメチルクロロシランやヘキサメチルジシラザンを用いた場合よりも、得られるエンドキャップ修飾シリカゲルの耐久性が格段に向上することを見出した。

[0022] エンドキャッピング反応は公知の方法および条件下で行うことができ、化学修飾したシリカゲルとエンドキャッピング剤を溶媒中で加温して反応を行ってよい。反応温度は好ましくは60～200℃、より好ましくは100～160℃であり、反応は液相中で行ってよい。溶媒は特に限定しないが、エンドキャッピング剤[II]とは反応せずかつ反応温度下で安定であるベンゼン、トルエン、キシレン、メシチレン等の芳香族炭化水素、ジクロロベンゼン等の置換芳香族化合物が好適である。反応圧は好ましくは通常大気圧であるが、0.15～0.49MPaの加圧条件下で反応を行ってもよい。反応時間

は好ましくは0.5～20時間、より好ましくは3～10時間である。エンドキャッピング剤[II]の使用量は、エンドキャッピング剤[II]/化学修飾シリカゲルの重量比で好ましくは0.01～10、より好ましくは0.05～1である。反応系にピリジン、イミダゾールのような塩基性化合物を添加することも好ましい。反応後、固液分離を行い、分離した固形分を十分にメタノールのような洗浄剤で洗浄し、乾燥して液体クロマトグラフィー用充填剤を得る。

発明の効果

[0023] 本発明によれば、200℃以下という比較的温和な温度で、したがって簡易な反応設備で短い製造工程でしたがって低コストで液体クロマトグラフィー用充填剤を製造することができる。

[0024] 本発明による液体クロマトグラフィー用充填剤は、シリカゲルの特性を失うことなく、液体クロマトグラフィー用充填剤としての選択性を変えることなく、耐酸性および耐アルカリ性が高く、長寿命である。したがって、これは特にペプチド、タンパク質等を含む生体試料の分析および分取に適している。

発明を実施するための最良の形態

[0025] 以下、本発明の実施例を幾つか挙げ、本発明を具体的に説明する。ただし、これら実施例は本発明を限定するものではない。比較として従来の一官能性シラン化合物および従来の一官能性エンドキャッピング剤を用いた例を挙げる。その耐酸性比較試験と耐アルカリ性比較試験、タンパク質の分離比較試験を行った。

[0026] 実施例1

球形高純度シリカゲル(ダイソー社製「ダイソーゲルSP-300-10P」、平均粒子径 $10\mu\text{m}$ 、細孔径300オングストローム、表面積 $100\text{m}^2/\text{g}$)20gを150mlトルエン中で共沸脱水した後、ジ-n-ブチルジクロシラン3.3gとピリジン2.4gを加え、この混合物を加熱して5時間還流させた。引き続きこの反応液にエンドキャッピング剤として、1,1,3,3,5,5-ヘキサメチルシクロトリシラザン0.8gを加え、この混合物を5時間還流させてエンドキャップ反応を完了させ、室温まで冷却した後、ろ過、メタノールによる洗浄、乾燥を経て液体クロマトグラフィー用充填剤20gを得た。

[0027] 比較例1

実施例1で用いたのと同じ球形高純度シリカゲル(「ダイソーゲルSP-300-10P」)20gを150mlトルエン中で共沸脱水した後、n-ブチルジメチルクロロシラン2.3gとピリジン1.2gを加え、この混合物を加熱して5時間還流させた。引き続きこの反応液にエンドキャッピング剤として、トリメチルクロロシラン2.0g、ピリジン1.8gを加え、この混合物を5時間還流させてエンドキャップ反応を完了させ、室温まで冷却した後、ろ過、メタノールによる洗浄、乾燥を経て液体クロマトグラフィー用充填剤20gを得た。

[0028] 比較例2

実施例1で用いたのと同じ球形高純度シリカゲル(「ダイソーゲルSP-300-10P」)20gを150mlトルエン中で共沸脱水した後、n-ブチルジメチルクロロシラン2.3gとピリジン1.2gを加え、この混合物を加熱して5時間還流させた。引き続きこの反応液にエンドキャッピング剤として、1, 1, 3, 3, 5, 5-ヘキサメチルシクロトリシラザン2.0gを加え、この混合物を5時間還流させてエンドキャップ反応を完了させ、室温まで冷却した後、ろ過、メタノールによる洗浄、乾燥を経て液体クロマトグラフィー用充填剤20gを得た。

[0029] 比較例3

実施例1で用いたのと同じ球形高純度シリカゲル(「ダイソーゲルSP-300-10P」)20gを150mlトルエン中で共沸脱水した後、ジ-n-ブチルジクロロシラン3.3gとピリジン2.4gを加え、この混合物を加熱して5時間還流させた。引き続きこの反応液にエンドキャッピング剤として、トリメチルクロロシラン2.0g、ピリジン1.8gを加え、この混合物を5時間還流させてエンドキャップ反応を完了させ、室温まで冷却した後、ろ過、メタノールによる洗浄、乾燥を経て液体クロマトグラフィー用充填剤20gを得た。

[0030] 評価試験

1) 耐酸性試験

実施例1および比較例1～3で得られた液体クロマトグラフィー用充填剤をそれぞれ、内径6.0mm、長さ250mmのステンレス製カラムにスラリー法により充填した。酸性移動相の通液前後についてそれぞれ液体クロマトグラフィー評価試験により標準サ

ンプルとしてウラシルおよびナフタレンを用いて保持時間を測定し、この測定値から保持係数(k)を求めた。

また、充填剤としてのエンドキャップ修飾シリカゲル中の炭素含有量を求めるために元素分析測定を行った。これらの結果から、酸通液前に対する酸通液後の保持係数の維持率および炭素含有率(エンドキャップ修飾シリカゲル1グラム当たりの炭素重量)の維持率を算出した。これらの結果を表1に示す。

カラムに酸性の移動相を通液することにより、エンドキャップ修飾シリカゲルが酸により加水分解されて母体シリカゲルからの修飾基の脱離が起こり、対象化合物の保持係数が低下する。表1からわかるように、実施例1のように化学修飾剤に二官能性シラン化合物[I]を用い、かつエンドキャッピング剤に二官能性環状シラザン[II]を用いると、酸通液後に最も高い保持係数の維持率および炭素含有率の維持率が得られた。これに対し、比較例1～3のように、化学修飾剤および／またはエンドキャッピング剤に従来の一官能性シラン化合物を用いると、耐酸性効果が十分でなく、実施例1に比べて低い保持係数の維持率および炭素含有率の維持率を示した。

[表1]

表 1. 耐酸性試験結果の比較

	実施例 1	比較例 1	比較例 2	比較例 3
化学修飾剤	ジ-n-ブチルジクロロシラン	n-ブチルジメチルクロロシラン	n-ブチルジメチルクロロシラン	ジ-n-ブチルジクロロシラン
エンドキャッピング剤	1, 1, 3, 3, 5, 5-ヘキサメチルシクロトリシラザン	トリメチルクロロシラン	1, 1, 3, 3, 5, 5-ヘキサメチルシクロトリシラザン	トリメチルクロロシラン
酸通液に対する保持係数の維持率 (%)	96	7	56	89
酸通液に対する炭素含有率の維持率 (%)	96	26	69	95

[0031] 液体クロマトグラフィー評価試験

移動相:メタノール/水=50/50(体積比)

流速:1.7ml/min

温度:40℃

検出器:UV 254nm

標準サンプル:

1)ウラシル(0.3mg/ml)

2)ナフタレン(1.8mg/ml)

インジェクション:1.5 μ l

[0032] 保持係数の算出

ウラシルの保持時間を t_1 とする。ナフタレンの保持時間を t_2 とする。ナフタレンの保持係数を k とする。保持計数(k)は以下の計算式により算出される。

$$k = (t_2 - t_1) / t_1$$

[0033] 酸性移動相の通液条件

酸性移動相: アセトニトリル／1%トリフルオロ酢酸水溶液 (pH=1) = 10／90 (体積比)

流速: 0.9 ml/min

温度: 70°C

通液時間: 15時間

[0034] ナフタレンの保持係数および炭素含有率の、酸通液前に対する酸通液後の維持率の算出

$$\text{維持率 (\%)} = \text{酸通液後の値} / \text{酸通液前の値} \times 100$$

[0035] 2) 耐アルカリ性試験

実施例1および比較例1～3で得られた液体クロマトグラフィー用充填剤をそれぞれ、内径6mm、長さ250mmのステンレス製カラムにスラリー法により充填した。カラムにアルカリ性移動相を通液して、カラムからの溶離液を全量回収し、回収液の元素分析によりSi溶出濃度を測定した。その結果を表2に示す。

カラムにアルカリ性の移動相を通液することにより、カラム内の母体シリカゲルの溶解が起こる。表2からわかるように、実施例1のように化学修飾剤に二官能性シラン化合物[I]を用い、かつエンドキャッピング剤に二官能性環状シラザン[II]を用いると、アルカリ通液によるSi溶出濃度は最も低く、すなわち耐アルカリ性が最も高い。これに対し、比較例1～3のように、化学修飾剤および／またはエンドキャッピング剤に従来の一官能性シラン化合物を用いると、耐アルカリ性に及ぼす効果が十分でなく、実施例1に比べてより高いSi溶出濃度を示した。

[表2]

表 2. 耐アルカリ性試験結果の比較

	実施例 1	比較例 1	比較例 2	比較例 3
化学修飾剤	ジ-n-ブチルジクロロシラン	n-ブチルジメチルクロロシラン	n-ブチルジメチルクロロシラン	ジ-n-ブチルジクロロシラン
エンドキャッピング剤	1, 1, 3, 3, 5, 5-ヘキサメチルシクロトリシラザン	トリメチルクロロシラン	1, 1, 3, 3, 5, 5-ヘキサメチルシクロトリシラザン	トリメチルクロロシラン
アルカリ通液により溶出する Si 元素濃度 (ppm)	1 2	2 2 3	1 3 4	2 3

[0036] アルカリ性移動相の通液条件

移動相: アセトニトリル/0.01N 水酸化ナトリウム水溶液 (pH=12) = 10/90 (体積比)

流速: 1.7ml/min

温度: 40℃

通液時間: 5時間

[0037] Si 溶出濃度測定

誘導結合プラズマ発光分析法 (ICP) を用いて測定を行った。

[0038] 3) タンパク質分離試験

実施例 1 および比較例 1 で得られた液体クロマトグラフィー用充填剤をそれぞれ、内径 6mm、長さ 250mm のステンレス製カラムにスラリー法により充填した。代表的なタンパク質の混合物を標準サンプルに用いて液体クロマトグラフィー評価試験を行った。実施例 1 および比較例 1 の各充填剤を用いたタンパク質分離試験で得られた液体クロマトグラフィーチャートを図 1 および図 2 にそれぞれ示す。

化学修飾剤に二官能性シラン化合物 [I] を用い、かつエンドキャッピング剤に二官能性環状シラザン [II] を用いて調製した実施例 1 の液体クロマトグラフィー用充填剤

は、化学修飾剤とエンドキャッピング剤に従来の一官能性シラン化合物を用いて調製した比較例1の液体クロマトグラフィー用充填剤と比較して、タンパク質の選択性およびその溶出順が変化することはないばかりか、従来は分離できなかった微量不純物(図1参照)の分離も可能になり、より高い分離性能を示した。

[0039] 液体クロマトグラフィーの操作条件

移動相

A液) アセトニトリル/水/トリフルオロ酢酸=20/80/0.1(体積比)

B液) アセトニトリル/水/トリフルオロ酢酸=60/40/0.1(体積比) 0～

25分 A液からB液への直線グラジエント

25～35分 B液100%

流速:1.7ml/min

カラム温度:35℃

検出器:UV220nm

標準サンプル:1)～6)の混合物

1) リボヌクレアーゼ A (2.0mg/ml)

2) チトクロム C (1.5mg/ml)

3) リゾチーム (1.5mg/ml)

4) ウシ血清アルブミン (4.0mg/ml)

5) ミオグロビン (2.0mg/ml)

6) オバルブミン (5.0mg/ml)

インジェクション:10μl

図面の簡単な説明

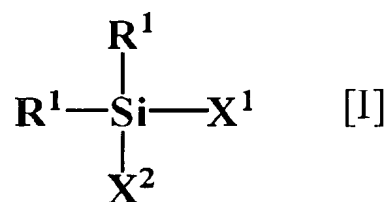
[0040] [図1]実施例1で得られた液体クロマトグラフィー用充填剤を用いたタンパク質分離試験の液体クロマトグラフィーチャートである。

[図2]比較例1で得られた液体クロマトグラフィー用充填剤を用いたタンパク質分離試験の液体クロマトグラフィーチャートである。

請求の範囲

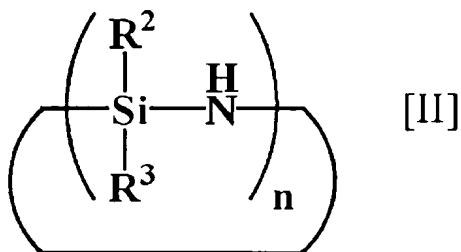
- [1] シリカゲルに、一般式[I]で表される二官能性シラン化合物による化学修飾を施し、得られた化学修飾シリカゲルに、一般式[II]で表される二官能性環状シラザンを用いてエンドキャップ反応を行うことを特徴とする液体クロマトグラフィー用充填剤の製造法。

[化1]



[式中、 X^1 および X^2 は、同一または異なり、水素原子、ハロゲン原子もしくは炭素数1～4のアルコキシ基であり、 R^1 は置換基を有していてもよいアルキル基またはアリール基である。]

[化2]

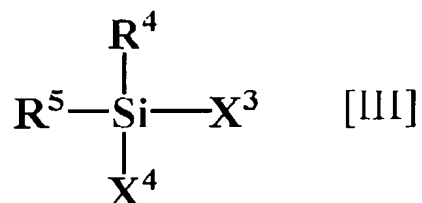


[式中、 R^2 および R^3 は、同一または異なり、炭素数1～4のアルキル基であり、 n は環を形成するユニットの数を示す値で、2～10の整数である。]

- [2] 一般式[I]中の R^1 としてのアルキル基が末端にアリール基、アミノ基、シアノ基もしくはニトロ基を有するか、または非末端にアミド基、カーバメート基、カーバマイド基、エステル基もしくはカーボネート基を有する、請求項1に記載の液体クロマトグラフィー用充填剤の製造法。
- [3] 一般式[II]で表される二官能性環状シラザンを一般式[III]で表される二官能性シ

ラン化合物と組み合わせて用いる請求項1または2に記載の液体クロマトグラフィー用充填剤の製造法。

[化3]

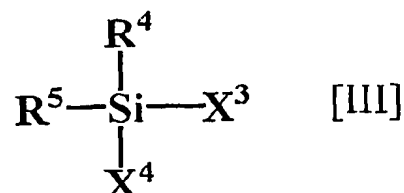


[式中、 X^3 および X^4 は、同一または異なり、水素原子、ハロゲン原子または炭素数1～4のアルコキシル基であり、 R^4 および R^5 は、同一または異なり、炭素数1～4のアルキル基である。]

- [4] 請求項1～3のいずれかに記載の方法により製造された液体クロマトグラフィー用充填剤。
- [5] 請求項4に記載の液体クロマトグラフィー用充填剤が充填された液体クロマトグラフィー用カラム。
- [6] 請求項5に記載の液体クロマトグラフィー用カラムを用いる化合物の分析方法または分取方法。
- [7] 請求項6に記載の化合物が生体試料に含まれるペプチドまたはタンパク質である、請求項5に記載の化合物の分析方法または分取方法。

ラン化合物と組み合わせて用いる請求項1または2に記載の液体クロマトグラフィー用充填剤の製造法。

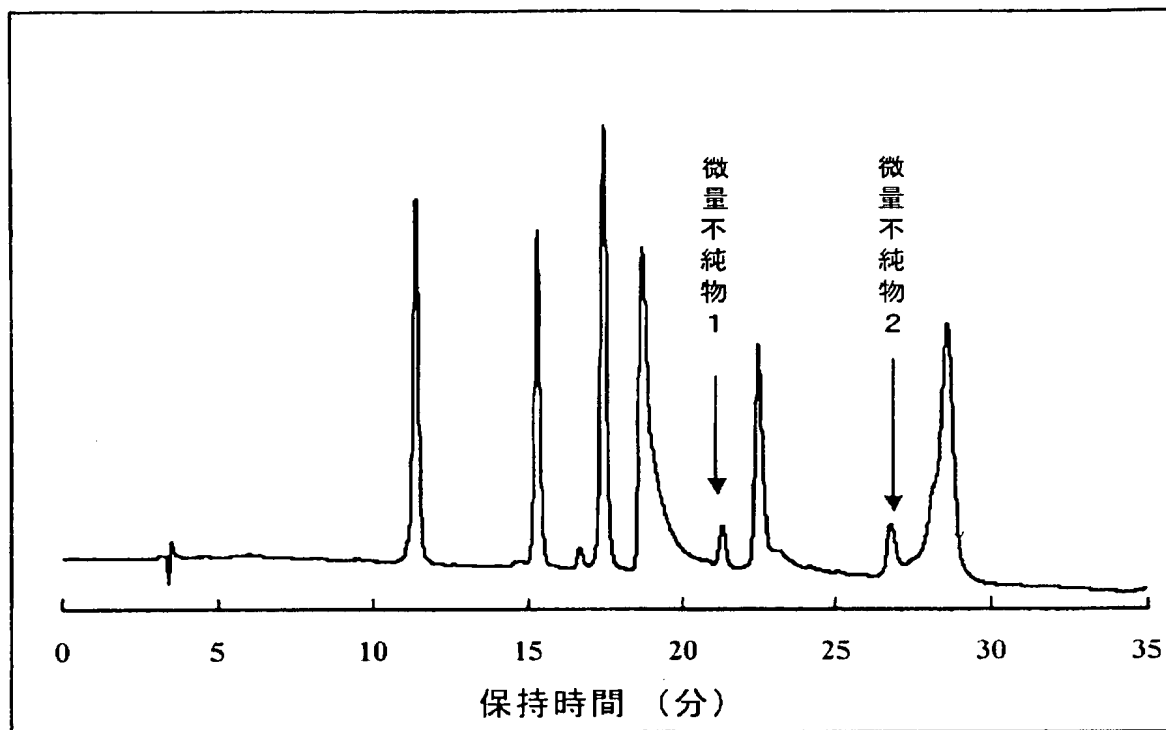
[化3]



[式中、 X^3 および X^4 は、同一または異なり、水素原子、ハロゲン原子または炭素数1～4のアルコキシル基であり、 R^4 および R^5 は、同一または異なり、炭素数1～4のアルキル基である。]

- [4] 請求項1～3のいずれかに記載の方法により製造された液体クロマトグラフィー用充填剤。
- [5] 請求項4に記載の液体クロマトグラフィー用充填剤が充填された液体クロマトグラフィー用カラム。
- [6] 請求項5に記載の液体クロマトグラフィー用カラムを用いる化合物の分析方法または分取方法。
- [7] 請求項6に記載の化合物が生体試料に含まれるペプチドまたはタンパク質である、請求項6に記載の化合物の分析方法または分取方法。

[図1]



[図2]

